

出國報告（出國類別：研究）

參加「第五屆國際生命條碼研討會(Fifth International Barcode of Life Conference)」

服務機關：行政院衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：林澤揚 技正

派赴國家：中國大陸

出國期間：102年10月26日至102年11月1日

報告日期：102年11月28日

# 目錄

目錄.....	1
摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	6
心得與建議.....	29
附件.....	31

## 摘要

國際生命條碼研討會(International Barcode of Life Conference)為 2 年舉辦一次的國際性研討會，本研討會是以探討 DNA 生命條碼(DNA Barcode)技術之相關研究成果為主軸，並將其拓展至各種與生命相關之領域之應用，如生態，環保，分類，演化，生物多樣性，生物資源利用和生物產業發展等。所謂生命條碼(DNA Barcode)技術，是一項頗為新穎的分子生物技術，其技術原理是期望藉由一小段 DNA 序列，作為可供辨識或鑑別物種以及標本的實驗構想，生命條碼技術的鑑別效力不受限於完整標本，其可鑑別包括不完整的、損壞的或未成熟的標本，就如同購買商品時只需藉由電腦掃瞄商品上的條碼即可將相關商品訊息一次揭露一樣的精準而便利。此構想最早是於 2003 年由於加拿大 Guelph 大學 Paul Hebert 學者所提出，並於著名學術雜誌發表相關文章後受到注意，由於技術概念極具效力、方便與新穎性，很快的就獲得許多分類學家、遺傳學家及生物演化學家的重視與認同並相繼投入研究，進而發展成一套技術學門。

國際生命條碼研討會主要是由“Consortium for the Barcode of Life”簡稱 CBOL 的國際性組織所主導，該組織是在 2004 年 4 月成立，成為統合全球從事各種物種基因條碼研究與發展的中心組織。第一屆國際生命條碼研討會於 2005 年 2 月在倫敦國家歷史博物館舉辦，本次為第五屆研討會，由中國科學院昆明植物研究所負責籌畫主辦，距離 2003 年生命條碼技術首次被提出以來正好是十週年，為生命條碼技術發展的重要里程碑，具有承先啟後的意義。

本屆大會的舉辦時間為 10 月 27 日至 10 月 31 日，10 月 27 日全天為會前會，主要安排屬於技術層面的活動及研討會，包含介紹 The Barcode of Life Data Systems (BOLD)——「生命條碼資料系統」的發展、更新及各項功能與介面的使用介紹；次世代基因定序技術 Next Generation Sequencing (NGS)的發展及其在生命條碼技術的應用等。10 月 28 日至 10 月 31 日則為安排各種科學性專題演講、壁報論文發表會、儀器及試劑廠商展示、學術科研機構參訪等活動。筆者藉此瞭解生命條碼技術發展與沿革，聆聽演講並學習生命條碼技術應用於生物物種分類、演化、物種鑑定、甚至發現新物種等之研究成果及方法步驟，可從中擷取對於業務範疇上可供延伸應用之科學新知與技術，更可印證筆者業務上應用到生命條碼的技術是否正確，與世界各國從事相關研究的

技術發展是否一致。至於筆者實驗過程中所遭遇到的疑問或無法克服的盲點，亦藉由與報告學者間的詢答獲得解答與啟發。同時收集生命條碼技術相關的科學資料以及 DNA 資料庫資訊等，提供筆者服務單位同仁從事檢驗技術研發時參考。筆者於壁報論文單元，同步發表利用 barcode gene 所進行之研究，將研究成果與來自各國之專家學者進行交流，交換研究心得，除能提升台灣在學術領域的國際能見度，並呈現筆者服務單位在生命條碼應用於檢驗檢測技術上之研究成果，更能藉由跟相同領域的專家們討論研究內容而得到更多的靈感。參與本次大會種種經驗期望有助於國內檢驗技術的發展與提升。

## 目的

國際生命條碼研討會(International Barcode of Life Conference)為 2 年舉辦一次的國際性研討會，研討會主要是由“Consortium for the Barcode of Life”簡稱 CBOL 的國際性組織所主導，研討會是以探討 DNA 生命條碼(DNA Barcode)技術之相關研究成果為主軸，並將其拓展至各種與生命相關之領域之應用，如生態，環保，分類，演化，生物多樣性，生物資源利用和生物產業發展等。

本研討會自 2005 年 2 月在倫敦國家歷史博物館舉辦第一屆大會後，即輪流在全球主要從事生命條碼研究的國度舉辦，第二屆研討會則是在 2007 年 8 月由台灣中央研究院生物多樣性中心負責人邵廣昭博士所主導在台北舉辦，第三屆研討會是 2009 年 11 月在墨西哥市舉辦，第四屆研討會是 2011 年 11 月在澳大利亞的阿得雷德大學舉辦。本次研討會則為第五屆，綜觀生命條碼技術的發展，從 2003 年該項技術概念由加拿大 Guelph 大學 Paul Hebert 學者首先提出，至今 2013 年第五屆國際生命條碼研討會的舉辦，正好是關鍵性的十年。與會學者專家無不期盼經過十年的努力，生命條碼技術學門可以蓬勃而永續的發展，並且廣泛應用於各種生命相關的領域，成為一種生物技術研究顯學。本次第五屆大會是由中國科學院昆明植物研究所負責籌畫主辦，參與者含括來自全球 43 個國家的人員，包括研究人員、學生、政府人員、非政府組織和民營企業代表等超過 400 多位的與生命條碼技術研究之專家學者或代表。除各種學術演講外，各國學者所發表的靜態論文展示也達到 80 餘篇。本屆大會各國專家參與踴躍，場面盛大，內容也極為豐富，筆者出席本會議其目的如下：

- 一、筆者出席此國際性研討會，參與大會安排的各種科學性專題演講、壁報論文發表會、儀器試藥展示、科研機構參訪等活動，聆聽學習全球生命條碼技術專家之研究成果，吸收生物技術的應用，瞭解國際間相關技術最新發展趨勢及其對於檢驗技術的利用性，匯集相關科學技術資訊，提供作為本署技術研發單位參考，以利增進本署之檢驗技術發展。
- 二、於壁報論文單元，代表本署發表利用 barcode gene 所進行之研究，將研究成果與來自各國之專家學者進行交流，交換研究心得，提升台灣的國際能見度，並呈現本署在生命條碼應用於檢驗檢測技術上之研究成果。代表本署展出檢驗研究成果之壁

報，並與其他參與壁報展出之作者探討檢驗方法及技術，加速建立國際溝通及聯絡之管道。

三、多方結識來自全球從事生命條碼科學研究的專家學者或代表，突破外交困境建立學術研究上的聯繫管道，以作為日後本署檢驗技術諮詢或請益的途徑，因應日後若發生緊急事件時的技術諮詢需求。

# 過程

## 一、研討會會前會

研討會會前會屬於純粹技術性之討論會，分為上午及下午兩個時段進行，開放所有報名參加會議的與會者參與討論，由於會議屬性為技術討論會，故大會建議出席者最好有相關技術經驗背景，以發揮會議的功能。上午時段的主題為有關生命條碼線上資料系統(BOLD)的介紹及討論。下午時段的主題則是次世代基因定序技術 Next Generation Sequencing (NGS) 應用於生命條碼 DNA Barcoding 的介紹與討論。

(1) The Barcode of Life Data Systems (BOLD)—「生命條碼資料系統」開發設立於 2005 年，該線上系統的設立被賦予一重要任務，那就是提供分子生物資訊學相關分析工具及資料庫，以支持研究人員建構更為完善的 DNA 生命條碼資料庫。在眾多領域專家的努力之下，過去的數年間，BOLD 系統已逐漸茁壯並成為一個強而有力的線上工作平台及分子生物資訊學的中心樞紐，藉由此系統許多國家的研究人員不斷的研究解碼並發表其所發現的生物 DNA 條碼，這正是 BOLD 系統最大的功用與成就。

本專題討論會，系統開發人員首先針對 BOLD v3.6 版的特點及功能做一全面性完整的介紹，並簡介如何使用該系統。上午的討論會內容包含本系統的中幾個主要主題功能的介紹，並教導新的使用者如何開始使用 BOLD 系統，展示 BOLD v3.6 中一些新的特點及功能，並以該系統介面圖像的方式展示產生並發表一個具備一定資料品質的 DNA 生命條碼的流程。對於有經驗的使用者也可藉此對於該系統功能進行複習，並從中獲的新系統功能的相關知識。下午時段，BOLD 系統開發人員，除繼續針對該系統相關功能與介面進行介紹外，並開放所有與會人員對於使用 BOLD 系統之後所發現的問題或相關經驗以及可以提出來共同討論或分享的部分，跟所有與會人員進行討論。

(2) 近年來由於次世代基因定序技術 Next Generation Sequencing (NGS)的發展，為許多基因體研究領域如生態及生物多樣性基因體研究，帶來革命性的應用。NGS 設備對於各種基因體相關之研究，能夠藉由其儀器基因定序之原理，產生大量的 DNA 序列信息，對於生命條碼的研究範疇，也產生相當大的助益。本時段的討論會議是由加拿大圭爾夫大學安大略生物多樣性研究所 (Biodiversity Institute of Ontario) 的兩位專家 Mehrdad Hajibabaei 及 Shadi Shokralla 主持。會議中針對次世代基因定序技術的各種技術，進行全面性的介紹，說明各種次世代基因定序技術之原理，方式，與技術優缺點，同時針對目前市面上各家生技公司所販售的各種 NGS 機型，做一全面性的介紹。續由出席的專家共同討論以 NGS 進行生命條碼研究時所遭遇的問題，大家以各自的經驗，提供出席者對於 NGS 技術的應用有更深的瞭解，提供作為各自進行相關研究時的技術參考。



## 二、第五屆國際生命條碼研討會大會

10月28日至10月31日為第五屆國際生命條碼研討會大會主要會議時間，主辦單位邀請各領域從事生命條碼的專家學者發表專題研究，介紹該技術於全球應用於生物分類學研究、國家公園生物多樣性研究、生態保育研究、物種鑑別研究、新物種之發現研究、次世代基因定序研究、生命條碼資料系統BOLD之全面性教育推廣計畫等等主題。另於每日下午時段安排各種生物分類之生命條碼研究研討會，其領域包含兩棲爬行動物、資料分析方法、教育、環境條形碼、環境監測、魚類、真菌和藻類、資訊學、昆蟲、海洋生物條形碼、藥用植物、次世代定序、其他無脊椎動物、植物、授粉、脊椎動物等共計16個研究學類，由此即可初步瞭解生命條碼技術的發展應用的廣度，也提供各種研究領域的學者專家相互觀摩學習的機會。由於研討會的場次很多且為同步舉行，與會者需事先瞭解自己的需求，選定特定場次聆聽，已獲取最新的研究成果或詢問相關科技資訊，本次大會的會議時程表，如附件一。

此次筆者出席本會議前，即因服務單位業務需求，急需收集植物鑑別檢驗技術相關之學術資訊，及特定植物專一性分子生物鑑別檢測技術之國際資訊，因此筆者特別鎖定出席”植物類”及”藥用植物類”之生命條碼研究學門的研討會場次，聆聽此兩項領域各國專家之研究成果、實驗步驟與方法、分析條件、儀器設備、試藥試劑等內容，充實自我知識，並將相關訊息傳遞回筆者服務單位，以利單位持續精進研究技術，將國際科研最新發展現況與技術帶回台灣，應用於保障國人食品安全與權益之用。以下將筆者於四天研討會中所聆聽及收集到的有關生命條碼研究的相關內容，進行概敘。

- (1) 中國科學院昆明植物研究所的Wen-Bin Yu學者報告中國新一代智能植物志iFlora的演進：建構国家重点保护野生植物的快速鑑別系統。植物誌(flora)是記載一個國家或地區已知植物種類的分類學著作，是研究植物分類、演化、生態、生物地理及植物多樣性保護等最基礎的書籍，因此各國幾乎都有其特有的植物誌。而近年來隨著DNA生命條碼技術的快速發展，該技術為物種鑑別提供分子生物領域更為精準

的分類判定標準，也促使準確而快速的鑑定植物物種成為可能。以DNA生命條碼技術為基礎，中國提出建構新一代智能植物誌—iFlora的理念，結合植物學及DNA生命條碼定序等技術，企圖建構更為便捷而準確可供快速鑑別與掌握植物分類的E化植物誌。作者之研究即是以一批”中國国家重点保护野生植物”為基礎，期望藉由DNA生命條碼技術，結合植物外觀型態、照片、生長的地理環境等資訊，不斷擴充中國目前所建置中的數位化植物誌iFlora，以期提供更為快速便捷的国家重点保护野生植物鑑別系統。



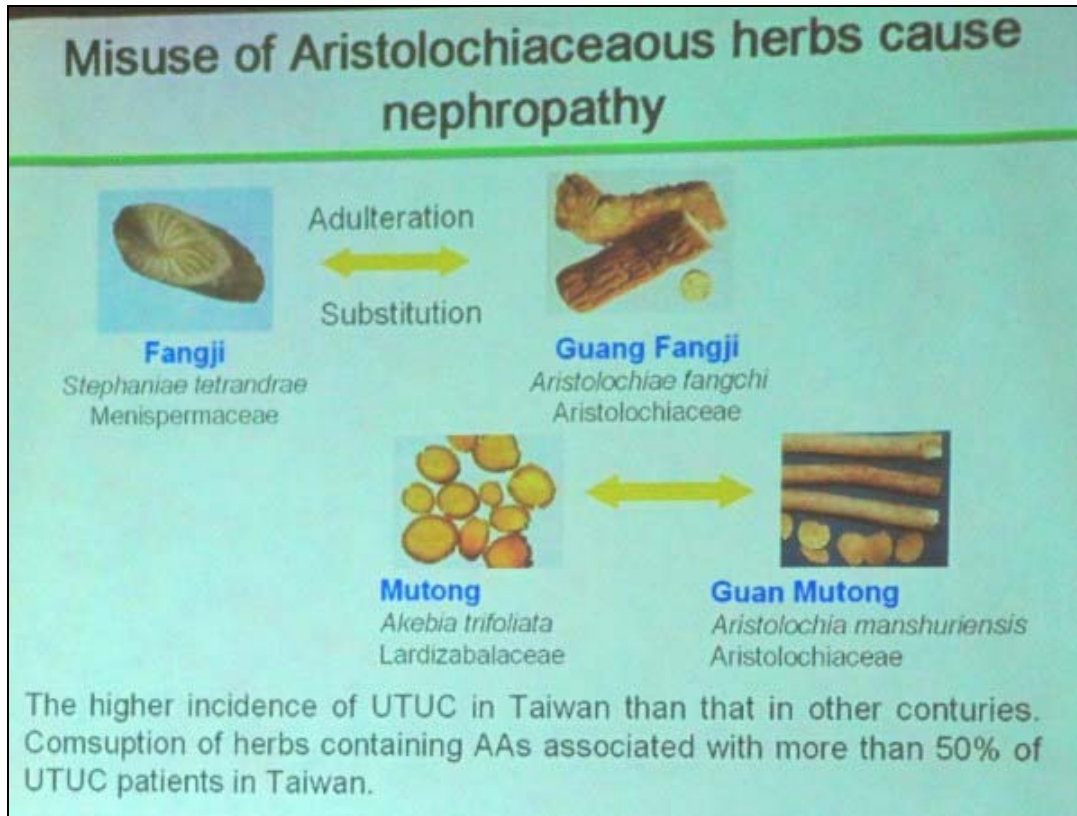
1999年中國林業部及農業部公布了第一批中國国家重点保护野生植物(簡稱NPKWP)，並獲得中國國務院的認可。此批国家重点保护野生植物包含了305個植物物種，分別屬於92個科及194個屬。而「中國国家重点保护野生植物」資料庫就成為中國行政部門保護與管理瀕臨絕種植物及具經濟價值野生植物的重點參考指標。藉由DNA生命條碼技術，一般的行政人員即使在沒有植物專家的指導下，也能以部分植物組織或碎片進行植物物種的鑑別。

中国科学院昆明植物研究所負責主導著iFlora發展的重要科研計畫，那就是建

構一套中國国家重点保护野生植物的快速鑑別系統，研究人員收集採集所有中國国家重点保护野生植物資料庫中的植物物種以及其分類學上相近的植物物種，進行所有植物barcode基因的定序分析，在此barcode基因的資料基礎上，再結合植物外觀型態描述、照片、生長環境等資訊即可發展成為iFlora資料庫的一部份，一旦iFlora資料庫建置成熟，日後使用者只需於iFlora系統中輸入barcode基因的序列資訊，即可快速搜尋得到其所對應的植物物種，並可供判定是否為国家重点保护野生植物，且由於iFlora系統結合了各種植物分類學的資訊，使用者可再藉由系統所提供的植物外觀、照片或者植物生長環境等資料，確認最終植物種類的判定，有此可見iFlora系統功能的強大以及其對於中國生態保育的重要性。iFlora以中國国家重点保护野生植物為一個起始點，該計畫最終目標是建置完成所有中國境內植物物種的完整數位化資料庫，因此iFlora的發展計畫不是只有幾年，而是要持續性的執行幾十年，有此可見中國在植物分類電子資料庫發展上的野心。目前iFlora仍屬於發展階段，故該系統仍未對外開放。

- (2) Shilin Chen 學者報告有關以 DNA barcoding 技術進行中藥材鑑別之相關研究。中國人運用 Traditional Chinese medicine (TCM)傳統中藥材已經有數千年的歷史，中藥材被廣泛應用於中國人臨床疾病治療，因此正確辨別中藥材成為安全而有效使用中藥材的基本程序。以往中藥材的鑑別大多依靠有經驗的人以外觀判定，現在由於生命條碼生物技術的發展，科學家可以使用短片段及標準化的植物基因序列區間進行物種判定，達成快速而準確鑑定中藥材真偽的目的。

中藥材的誤判及勿用，不但無法發揮應有的療效，反而造成健康上的危害，例如誤食含有馬兜鈴酸的中藥材會造成腎臟方面的病變，坊間常見“防己”以“廣防己”冒充、“木通”以“關木通”冒充，這些被冒用的中藥材都是含有有害成分馬兜鈴酸。在台灣罹患上泌尿上皮癌的患者數量遠高於其他國家，這些患者當中有超過半數都與食用含有馬兜鈴酸的中藥材有關，由此可知，正確鑑定中藥材對於民眾健康安全是無比重要。



作者經過許多物種之基因比對研究後提出以ITS2及psbA-trnH基因作為鑑定中藥材物種的分生檢驗標準方法，其具有高度有效能與可靠性。作者並聯合其他研究團隊發現以ITS/ITS2兩種基因，可有效鑑別種子植物，以COI搭配ITS2基因可以有效鑑別動物物種。作者以ITS2加psbA-trnH基因序列建構兩個中草藥資料庫及網站 (<http://its2-plantidit.dnsalias.org> 及 <http://psba-trnh-plantidit.dnsalias.org>)。

作者並以ITS2 barcode進行許多種形式中藥材料之鑑別，包含中藥原始植物、中藥粉末及切片中藥等，研究成果顯示ITS2基因也可以針對植物樹皮、植株、植物根部、藤蔓、花等部位進行基因鑑別，作者並發表一本以ITS2基因鑑別中藥的書籍，書名為「中藥DNA條形碼」，書中記載超過10000個中藥材樣品之研究，以及超過4000個以DNA條形碼鑑別中草藥攙偽之研究。

基於DNA條形碼技術的成熟，作者已擬定完成DNA barcoding 相關技術指引，制訂以條形碼技術鑑別中草藥的SOP，並獲得官方認可收錄於”中華人民共和國中藥典2010年版”的附錄中。另作者亦公布其所建立的”中藥材DNA條形碼鑑定系統”網站([www.tcmbarcodes.cn](http://www.tcmbarcodes.cn))，使用者只需要在網頁中相關欄位貼上DNA條形碼

序列，藉由該系統比對即可快速得知是哪一種中草藥。



此外，作者也將此技術應用於更廣泛的中藥物質之鑑別研究，如冬蟲夏草分類研究、羌活之攙偽研究、人蔘之鑑別研究、金銀花之攙偽研究、樹皮類中藥材之鑑別研究等。總結來說，作者認為 DNA barcoding 鑑別技術已將發展成熟並成為中藥材鑑別的利器，其研究成果將有助於傳統中藥材的品質管控以及正確安全使用中藥材。

(3) Ohio 大學的 Melanie Schori 學者報告有關以 DNA barcoding 技術研究巴基斯坦國內之芳草藥植物。在巴基斯坦，芳草藥植物常被製作成藥用品並作為醫藥用途。但對於這些出售給個人或公司的藥用植物材料的品質卻無法進行有效的管控。在巴基斯坦國內，大規模種植藥用植物並不普遍，因此大部分原料需仰賴是從其他國家進口或從野外採集，這些要用植物在當地販售時，其型態各異，如根部、樹皮、樹枝、葉、花或種子等，且多以當地語言及當地的通俗名稱標示並販售，基於上述種種因素使得這些藥用植物被錯誤鑑定或因外觀誤認導致錯誤採集的可能性大大增加。由

於這些植物是被用來當成藥材，因此，錯誤鑑定或是在真的藥材中摻雜其他假的或植物成分，將導致這些草藥產品的療效大幅降低，嚴重的將引起中毒，不可不慎。植物DNA Barcoding 技術即非常適合用來作為這些藥用植物原材料的鑑定與確認，並可發展成為藥用植物品質管控的技術平台。

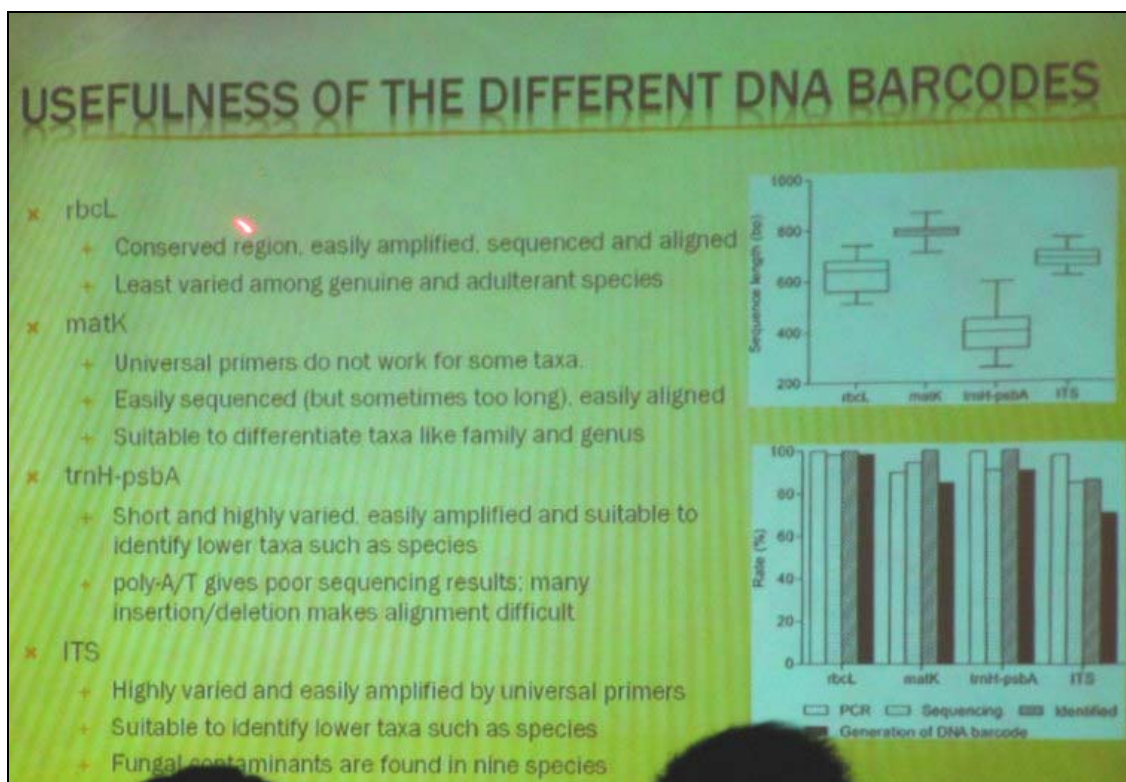
研究中作者收集的植物種類包含23個科、43個種，以rbcL, matK, 及 psbA-trnH 生命條碼基因進行研究，從所獲得到的生命條碼基因序列，確認有6個市售藥用植物中確有摻偽或是被錯誤判定的情況，這些被誤判或摻偽的藥用植物種類包括洋甘菊(*Matricaria recutita* var. *chamomilla*)及牛膝草(*Hyssopus officinalis*) 等，作者並指出在Gene bank資料庫中有關rbcL, matK, 及 psbA-trnH的基因序列並不完全正確，其中存在有錯誤的基因序列。而從事植物分類DNA Barcoding的研究工作時，正確的植物標本仍是決定研究結果成功與否的關鍵因素。研究中並以這些藥用植物的生命條碼基因序列與其姊妹品系植物進行比對，結果發現對於研究中的藥用植物種原親源鑑別效力上，以psbA-trnH 生命條碼基因的分辨效果最佳，其次才是matK及rbcL 生命條碼基因。

(4) Ohio 大學的 Melanie Schori學者報告有關如何改善進行生命條碼分析時PCR之效率及生命條碼資料分析。執行市售藥用植物產品中摻偽研究，DNA barcoding 技術可說是一種極具效力的方式。但是要從藥用植物中產生出DNA barcode基因序列資料並進行分析以確認其鑑別效力可說是一項極具挑戰的工作。要進行相關研究，首先就必須能夠順利的針對植物的barcoding 基因區間進行PCR反應，但PCR反應經常會受到藥用植物的二級代謝物所抑制，因此作者不斷探討影響PCR反應的各種影響因子，包括優化植物DNA的萃取方法、PCR引子的基因序列、使用不同種類的PCR反應酵素等，以找尋出最好的PCR反應條件。

在測試過程中，作者收集巴基斯坦境內15個目、25個科、43個屬、43個種的植物標本進行實驗，標本型態則包含葉子、花、種子、根部、小枝幹、樹皮等。實驗嘗試調整PCR反應溶液中MgCl<sub>2</sub>的濃度，分析所用之DNA barcode的PCR引子序列

的正確性，使用不同的PCR反應方法如gradient PCR 及touchdown PCR等技術，及研究不同植物DNA barcode的PCR引子最合適的黏合溫度等，最終並提出最佳的PCR反應條件供大家參考。研究中作者可將rbcL基因及matK基因的PCR成功率提高至96%及79%，將這些序列以GenBank 資料進行比對，發現GenBank 資料庫中有許多DNA barcode基因序列出現錯誤，藉由其研究成果也可幫助資料中錯誤基因序列的修正或移除。

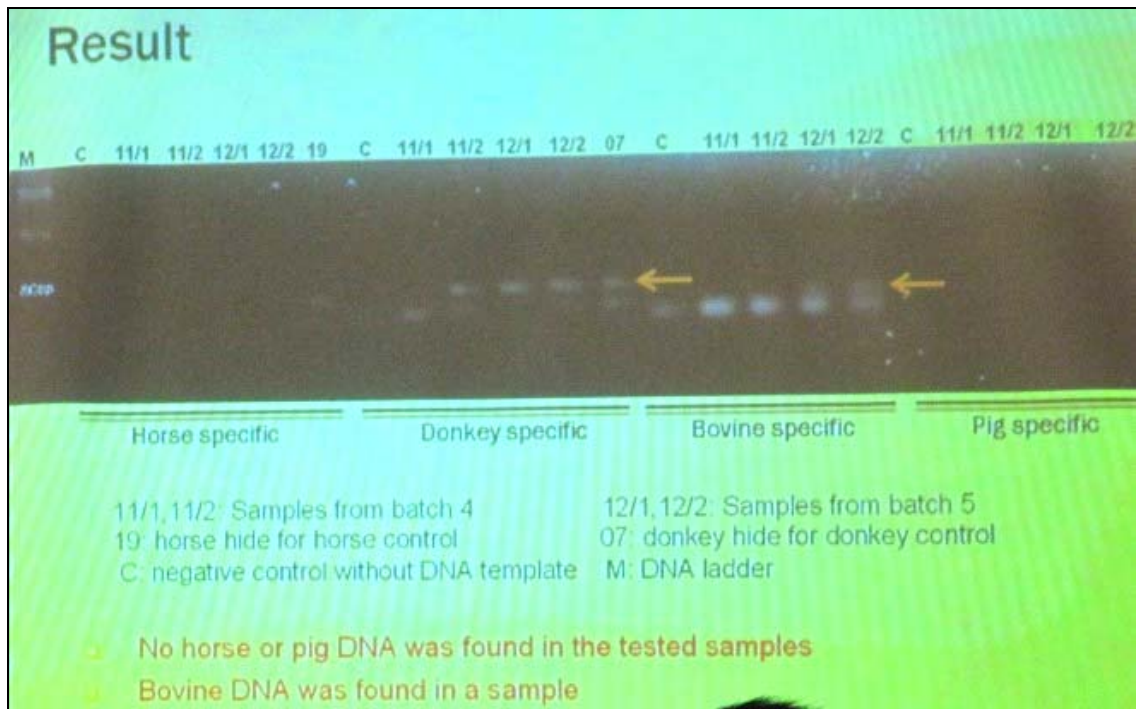
- (5) 香港中文大學 Pang-Chui Shaw 教授介紹其利用 DNA barcode 技術進行中草藥物質之鑑別檢測。中草藥在中國已有數個世紀的歷史，要讓中草藥發揮其應有的藥效則需取決於所採用的中藥材的真偽，但是很不幸的中草藥材的攙偽或攙假卻是時有所聞。由於中藥材採集之後到供人們使用，過程中需經過如乾燥等加工程序，因此以植物型態鑑別中草藥材真偽幾乎是不可行，所幸 DNA 分子鑑別技術的發展為中草藥鑑別開闢的一嶄新局面。作者以”涼茶”進行中藥材成分檢驗，”涼茶”是起源於中國南方的飲料，具有解渴保健清熱緩解疼痛增加抵抗力等功效，其製作方法可以是以單一種或多種植物混和煎煮而成，已於 2006 年被指定為中國非物質文化遺產之一，作者 DNA barcode 技術研究坊間”涼茶”的植物成分，其所使用的 DNA barcode 基因包含 rbcL、matK、trnH-psbA、ITS 等常用於植物物種鑑別的基因區間，成功鑑別用於製作”涼茶”的中藥材中所存在的攙偽或誤用之植物種類，如”地膽草”以”白花地膽草”混充、”淡竹葉”以”假淡竹葉”混充。



作者開發以 DNA barcode 搭配 LAMP PCR 技術鑑別中藥材，如利用 ITS 基因鑑別”白花蛇舌草”與其相關連之 13 種植物物種，發現白花蛇舌草有以水線草攙偽之情形；以葉綠體的 trnH-psbA 基因鑑別”馬兜鈴屬”植物與”烏頭屬”植物；作者並以 DNA barcode 研究冬蟲夏草常見之攙偽品”中國古尼蟲草”，發現在中國以感官法方式判定”中國古尼蟲草”很容易造成誤判，也藉此證明 DNA barcode 可協助判定植物物種樣品的來源。

研究並針對高度加工之中藥材發展 DNA barcode 技術，並以”阿膠”中藥材進行研究，”阿膠”是以驢皮煉製炮製而成的膠質，用於改善血虛萎黃，眩暈，心悸等症狀，為補血之佳品。因為”阿膠”有滋陰補血、安胎、補腎的功用，與人參、鹿茸一起被譽為「中藥三寶。」。近年來由於原料價格上漲和市場需求，使得阿膠價格連年上漲達數倍之多，坊間因此也出現攙偽品，。作者購買市售”阿膠”產品並以馬、驢、牛、豬等動物類 DNA barcode 進行分析，結果顯示馬、豬呈現陰性，但驢、牛則呈現陽性，代表市售”阿膠”產品確有以牛皮摻假之情形。





本篇報告亦提到，針對中藥材之 DNA barcode，香港中文大學已經建置了一套線上中藥材 DNA barcode 資料庫，稱之為 medicinal materials DNA barcode database(MMDBD)，其中所包含的中藥材基因資料有超過 1661 個種、36679 個基因序列、369 個中藥材圖片等，系統中所包含之 DNA barcode 資訊種類，植物類為葉綠體 matK & rbcL 基因輔之以所有葉綠體 DNA 基因區域、ITS 及核糖體 RNA 序列；動物類及昆蟲類為粒腺體 CO1 基因輔之以所有粒腺體 DNA 基因區域；真菌類則為 ITS 基因。目前該資料庫是開放的，可供研究人員以關鍵字、漢字筆劃數等方式進行中藥材物種搜尋，也可以 DNA barcode 序列比對鑑別中藥物種。

Medicinal Materials DNA Barcode Database

Home Search BLAST Data Submission Help & Information

**Why do we need to identify medicinal materials from natural sources?**

Medicinal materials from natural sources have been used for centuries in China and other countries. They have been recognized as particularly suitable for treating modern diseases such as cardiovascular diseases, asthma and other long-term illnesses. Substitutes and adulterants are often introduced intentionally or accidentally, thus seriously interfering with their therapeutic effects, even leading to life-threatening poisoning. In 1989, two people in Hong Kong suffered serious neuropathy and encephalopathy after consuming a broth made with the roots of *Podophyllum hexandrum*, a toxic herb mistaken as *Gentiana rigescens*. In 2001, 63 people in the Netherlands reported symptoms of general malaise, nausea and vomiting following consumption of an herbal tea, with Japanese star anise (*Illicium anisatum*) mixed in the product. Aristolochic acid nephropathy has also been reported in Hong Kong, Korea and Belgium due to the erroneous substitution with herbs containing aristolochic acids. From March 2004 to May 2006, it was reported 10 cases of aconite poisoning in Hong Kong were reported. In four of them, the aconite herb was not listed in the written prescription. In 2008, a woman in Singapore suffered from antimuscarinic poisoning consuming brew made with *Datura metel*, which is a toxic herb mistaken as *Rhododendron molle*.

Statistics:

- Species: 1661
- Sequences: 36679
- Photos: 369
- References: 2491

Updated October 2013

**DNA barcoding of medicinal materials**

Medicinal materials are traditionally identified by their organoleptic characteristics and other physical

**Applications on taxonomy and identification**

**Taxonomy**

- Law et al. Molecular analyses of the Chinese herb *Leigongteng* (*Tripterygium wilfordii* Hook.f.) *Phytochemistry* (2011) 72:21-26

Lou SK et al. (2010) *BMC Genomics* 11: 402  
<http://www.cuhk.edu.hk/icm/mmdbd.htm>

(6) 尼泊爾的學者 Gaurav Gyanwali 發表以 DNA barcodes 對藥用植物胡黃連 *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Pennell) Hong 的研究。從尼泊爾 Terai 地區(海拔 100 公尺以下)，經丘陵地帶到高海拔的西馬拉雅山的區域範圍內(海拔高於 4000 公尺)，生長著超過 1950 種的藥用芳香植物 Medicinal and Aromatic Plants (MAPs)，但是隨著許多因素如都市化、土地過度開發、非科學性採集、全球氣候變遷等，使得這些藥用芳香植物數量快速減少中。因此如何有效管理、運用及保護這些珍貴的藥用芳香植物就顯得更佳迫切了。

胡黃連 *Neopicrorhiza scrophulariiflora* (Pennell) Hong，具退虛熱，除疴熱，清濕熱，解毒的藥效，為具有高經濟價值的重要的中藥材，主要分布於東西喜馬拉雅地區的特有植物，在中國境內的分布區為，西藏、雲南、四川等地，其他分布地區則包括不丹、尼泊爾等國家，由于人為的過度採集和牧場擴張導致其分布區面積縮小，使得胡黃連在尼泊爾也已被國際自然保護聯盟 IUCN 等組織列為瀕危物種名錄

之一。作者以四種 DNA barcode 基因(ITS, matK, rbcL 及 trnH-psbA)進行胡黃連之分生演化史及分類之研究。其步驟包含樣本收集(於尼泊爾三個地點所採集而來的 8 個胡黃連樣本)、外觀型態鑑別、DNA 萃取、DNA barcode 基因 PCR 檢驗,最終再進行資料分析。基因序列分析所用之軟體為 Codon code Aligner v. 4.2.1 版,分生演化史及分類分析軟體為 MEGA v. 5.2.2.版。實驗結果顯 matK 及 rbcL 兩種 barcode 基因的 PCR 增幅效率達百分百,但 nrITS 及 trnH-psbA 兩種 barcode 基因的 PCR 增幅效率則僅有 87.5%。研究成果顯示作者分析胡黃連樣本的 ITS, matK 及 rbcL 三種 barcode 基因序列,並未發現有序列差異,其原因推測是所採集的胡黃連樣本太少所致。但在 trnH-psbA barcode 基因序列分析結果則可以發現有幾個核苷酸序列的差異,這表示 trnH-psbA 基因比較適合作為胡黃連物種間分類的 barcode 基因種類。而依據 matK barcode 基因的分析結果,尼泊爾的胡黃連物種皆被歸類在同一族群,因此 matK barcode 基因應可被應用於胡黃連物種與其他植物物種的分類研究用途。

- (7) 北京中國中醫科學院中藥資源中心的 Qing-Jun Yuan 博士發表有關以 DNA barcode 技術研究中藥材繖形科/當歸屬 *Angelica*(Umbelliferae)中藥材及中藥植物的成果。作者之所以研究當歸屬植物是因為這一屬有高達 19 個種的藥用植物,經濟價值高,而在中國中藥典所記載收錄的則有 3 個種,為 *A. sinensis*(當歸)、*A. biserrata*(重齒當歸-獨活)、*A. dahurica* (野當歸-白芷),這三種中藥材坊間多常見其摻偽品,其中 *Leristicum officinale*(歐當歸)就是最常見的替代偽品,且基於價格的原因,在市面上 *A. sinensis*(當歸)與 *A. biserrata*(重齒當歸-獨活)更是常見被互相作為其替代偽品。

## Why *Angelica*?

- Flora Republicae Popularis Sinicae: 26 species, 5 varieties, 1 forma
- Medicinal plants: 19 species
- 3 species are recorded by Chinese Pharmacopoeia
- Many substitutes:

official materia medica	substitutes
<i>Angelica sinensis</i> (Danggui)	<i>A. acutiloba</i> , <i>A. nitida</i> , <i>A. gigas</i> , <i>Levisticum officinale</i> (Oudanggui)
<i>Angelica biserrata</i> (Duhuo)	<i>A. anomala</i> , <i>A. porphyrocaulis</i> , <i>Levisticum officinale</i> (Oudanggui)
<i>Angelica dahurica</i> (Baizhi)	<i>A. polymorpha</i>
- *A. sinensis* (Danggui) and *A. biserrata* (Duhuo) are reciprocally substituted in market for price.

作者首先以四種植物 barcode 基因(rbcL, matK, trnH-psbA 及 ITS)進行研究，步驟包含樣品採集、評估四種植物 barcode 基因的結果、生命條碼的差異(barcoding gap) 分析、演化樹分析，再以最合適的 barcode 基因種類進行中藥材原材料及中藥切片的判別研究。研究所收集的樣本包含當歸屬中屬於藥用以及非藥用的植物物種，共計有 23 個種、94 個當歸屬植物葉片樣品，幾乎涵蓋中國境內該屬植物所有的分佈生長區域。分析結果顯示四種植物 barcode 基因在植物物種層級的鑑別力 (discriminating power)，rbcL 基因為 22%，matK 基因為 43%，trnH-psbA 基因為 35% 而 ITS 基因則為 78%，結果是以 ITS barcode 基因的鑑別力最優，最適合最為當歸屬植物物種的 DNA 鑑別之用。

研究中進一步進行中藥材原材料及中藥切片的鑑別研究，共計由 10 個中藥鋪中採購當歸屬中藥切片，並從 4 個中藥產地採集當歸屬之中藥材原材料進行 ITS barcode 基因分析，結果顯示市售的 *A. sinensis*(當歸) 及 *A. biserrata*(重齒當歸-獨活) 藥材普遍存在以 *Levisticum officinale*(歐當歸)假冒混充之情形。並且發現 *A. dahurica* (野當歸-白芷)植物在加工製作成中藥切片的製程中，當加熱乾燥的溫度超

過 60 度，將直接影響後續 PCR barcoding 基因分析的效果，使失敗率大幅增加，此時，作者建議可以 ITS2 基因作為後補的 barcode 基因種類，因為 ITS2 基因對於較難進行 DNA barcode 基因分析的中藥材，具有較容易成功進行 PCR 增幅反應及基因定序的特性。本研究提供了有心以 DNA barcode 技術進行中藥植物以及中藥材鑑別研究的學者一些參考的思維。

### 三、壁報論文展示

本次第五屆國際生命條碼大會所安排的壁報論文，共分為 15 個主題，各大主題名稱及學術論文數量如下表，壁報總數目 86 篇。其中以魚類、昆蟲、植物與藥用植物類的壁報數目最多，這也間接反映出目前有關 DNA 生命條碼學門的研究仍以這三大類所佔的比例最重：

主題		篇數
Amphibians and Reptiles	兩棲爬行動物	2
Data Analysis Methods	資料分析方法	1
Education	教育	4
Environmental Barcoding	環境條形碼	3
Environmental Monitoring	環境監測	5
Fishes	魚類	10
Fungi and Algae	真菌和藻類	9
Informatics	資訊學	2
Insects	昆蟲	14
Marine Barcoding	海洋生物條形碼	9
Medicinal Plants	藥用植物	9
Next Generation Sequencing	次世代定序	1
Other Invertebrates	其他無脊椎動物	1
Plants	植物	12
Pollinators	授粉	1
Vertebrates	脊椎動物	3

筆者出席本次大會，亦於壁報論文單元同步發表壁報論文，將本署利用 barcode gene

所進行之研究成果製作成海報參與學術研究展示，將本署之研究成果與來自各國之專家學者進行交流，交換研究心得，藉此截長補短，更能提升本署檢驗研究的品質及激發研究的靈感。本次筆者所發表的壁報論文為「以 real-time PCR 原理開發食品中牛樟芝成分之快速鑑檢測技術—Development of real-time PCR approach for rapid detection of *Antrodia cinnamomea* in foods」。

牛樟芝在台灣被嘗試作為藥用已有數十年的歷史，有許多民間案例顯示因食用牛樟芝後疾病症狀明顯改善，過去數十年經過許多學術單位、專家學者投入大量心力從事牛樟芝的研究得到豐碩的成果，牛樟芝的成分對抗氧化、改善肝炎或肝纖維化問題、抑制腫瘤細胞生成、提升免疫力、抗血管新生作用的發生、抗發炎反應、降血脂等，都有顯著醫療效果。牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*) 天然宿主為台灣牛樟木，是台灣特有菌種，由於牛樟木在台灣已瀕臨絕種因此牛樟芝更是稀少，故被視為獨特而珍貴的藥用真菌。由於野生牛樟芝幾乎已遭盜採殆盡，目前之科學研究則企圖以人工栽培方式來替代野生牛樟芝解決原料不足的問題。但由於樟芝的培育技術困難且菌種生長緩慢，尚有許多問題仍需克服。目前牛樟芝在台灣之栽培技術可分液態發酵菌絲體、固態培植及椴木栽培天然子實體等三種。牛樟芝目前已廣泛應用於保健食品，故需發展一套DNA鑑別技術以有效鑑別市售相關產品中牛樟芝品質與真偽，以便對於牛樟芝產品進行管理，保障消費者權益。本署之研究收集NCBI網站上發表多種物種的ITS(internal transcribed spacer) barcode gene序列，設計出牛樟芝專一性引子及探針，以PCR與real-time PCR儀器進行實驗，復以食品工業研究所購得的參考菌株測試皆獲得良好結果，另以數十種真菌類物種進行專一性測試，確定本署研究所建立之方法對於牛樟芝具有高度專一性，且本方法的最低偵測濃度試驗可達到0.5 pg DNA含量。以本方法對市售33件牛樟芝產品進行調查，結果皆檢出牛樟芝成分，其中有8件產品(含飲料類型3件)僅檢出極微量牛樟芝成分。本署研究開發之牛樟芝專一性DNA檢測技術，將可作為衛生主管機關把關市售牛樟芝產品品質的有效科學工具。

筆者於壁報論文發表會現場之情形如下，本次所展示的本署牛樟芝檢驗技術成果之海報及論文摘要如附件二所示。

大會安排開放所有與會人員壁報論文閱覽及詢答的時間僅有一個小時，其他時間壁報展示區域都不對外開放，且展示時間結束後展場隨即撤除，程序上過於短暫。筆者所展示的壁報論文即有多位學者前來詢問，因此沒能太多機會閱覽其他學者的壁報論文，是美中不足之處。





#### 四、參訪昆明植物研究所植物園及大會閉幕式

本次第五屆國際生命條碼大會是由中國科學院昆明植物研究所負責籌辦。昆明植物研究所成立於 1959 年，位於雲南省昆明市黑龍潭區，與本次大會舉辦場地相去不遠，是中國重要的植物綜合研究及教育中心，在中國境內及國際上均享有盛名，單位的宗旨為藉由多面向植物學科的創新與研究成果的累積，為中國的植物科學發展、國家和區域生物多樣性保護、生物資源持續利用和生物產業發展尋求發展契機。該單位所設定三個重點研究目標包含：主導“中國新一代智能植物志 iFlora”研究計畫、新藥創新研發、植物核心資源與功能基因組學研究。重點培育主題方向為：植物分類學與生物地理、植物化學與天然產物、植物功能基因體學與種質資源、民族植物學與生物技術、保護園藝學與植物品種馴化等。

大會於最後一天下午安排所有與會專家學者參訪昆明植物研究所植物園，園區面積廣大，並分為許多區塊，種植各式各樣的植物，花木扶疏，除供作研究用途之外，平常並提供作為民眾觀光休憩或者旅遊的景點，儼然成為昆明地區民眾的花園。主辦單位並帶領大家參觀研究所所設置的「種子博物館」，館內以導覽看板及靜態展示的方式，呈現各種植物種子的樣貌、型態、特性、分類、演化、地理分佈等等的科學資訊，提供教育的用途，一般參觀民眾即可藉由館方專業的導覽與解說，獲得植物界的科學新知，真正達到寓教於樂的目的。

植物種源是各國農業發展、生物資源利用、生物產業發展及生物多樣性等最重要根源，與一個國家的永續發展及糧食自主等息息相關，因此世界各國無不積極保存其國內的各種植物種子，並收集其他地區或國家之植物種子以成立其種源資料庫，以台灣為例，農委會農試所就設立有台灣的植物種源庫，而昆明植物研究所即設置有中國境內重要的植物種源庫，同時亦設置有植物標本館，為其生命條碼領域之研究奠定極為強大而穩固的研究基礎。





最後，大會在昆明植物園的東園園區廣闊的草坪辦理大會閉幕式，大會提供一開放而舒適的場地，讓來自各個國家從事 DNA 生命條碼研究的專家們盡情進行心得交換與

討論，彼此以各自的研究專長進行交流，激發各種研究靈感，更提供來自各國不同領域的學者們一個互相介紹認識的機會，尋找各種合作研究的契機，這也正是參與國際性學術研討會另一種目的與功能。



大會閉幕式中，幾位國際生命條碼聯盟 CBOL 的重要成員，包含昆明植物研究所所長李德銖及首先提出生命條碼構想的加拿大分子生物多樣性研究所所 Paul Hebert 博士

等專家，共同簽署發表關於促進 DNA 生命條碼和生物多樣性科學的共同宣言，稱之為”昆明宣言”，本宣言的目的是凝聚共識，做為生命條碼聯盟持續推動相關研究的一個共識與目標方向，第五屆國際生命條碼大會昆明宣言文件，如附件三所示。昆明宣言的主要內容如下：

生命條碼技術是研究生物多樣性學科的一種革新。透過國際性協調組織推動以下的共識項目，將可促進生命條碼科學的發展；生命條碼的應用以及其對於社會的影響力：

- 1.精進有關生命議題之各領域有關生命條碼之科學。
- 2.持續發展技術，擴大生命條碼技術的能量與效率。
- 3.藉由各種機制，包含非營利性質與商業性質的活動，發展並應用生命條碼技術以面對及因應各種社會的挑戰。
- 4.發展參考資料庫及相關的標準（包含生命條碼研究技術標準、資料研究互通性標準、運用生命條碼技術的管理標準）。
- 5.有關生命條碼資料、技術及發表資料的獲得的便捷性。需體認基於遵從國際法與各國法律有關取得與利益分享，基因資源的利用應受到適當約束。
- 6.廣納其他合作伙伴，包含國家政府單位、政府間與政府間的機構、私人機構、非政府組織等。
- 7.擴展全球生命條碼社群及國際合作，尤其應該特別重視發展中國家。
- 8.發展及提供訓練計畫以建立全球性的生命條碼研究能力，並將生命條碼技術融合到各階段各種型態的教育系統中。

## 心得及建議

1. 本次大會所安排的分會場演講主題，除安排多場次是有關植物類之生命條碼研究，還特別將 medicinal plant 獨立為一個主題，顯示大會對於藥用植物分類研究的重視，且此主題有為數眾多的大陸學者發表其關於生命條碼應用於中藥材分類鑑定之研究成果，顯見以分生技術針對中藥材之研究已不僅僅是學者口中所呼籲應重視的研究課題，大陸官方已採取積極的態度不斷在各種國際性學術會議中凸顯對中藥材研究的重視，更從此次會議中為數頗多有關中藥材之學術報告，深深感覺中國大陸有強烈主導全球中藥材生命條碼研究的意圖，企圖成為該領域科研的領頭羊，台灣與中國大陸因為文化背景重疊的關係，在傳統中醫學領域的研究亦有極大的重疊，瞭解到大陸對於中藥研究的重視之後，深深期盼台灣更應該以本身深厚的學術研究基礎，持續重點加強對於中藥材之研究，以期與大陸中藥材之科研平起平坐。
2. 從許多有關藥用植物生命條碼的研究成果得知，目前世界各國對於藥用植物重視的課題為如何正確判定市面所販售的藥材的正確性，是否有刻意混雜或錯誤採集的情形。由於藥用植物多數仍以原材料型態入藥，而許多種原相近的植物外觀極為相近，人工採集常會誤判，其結果將大大影響植物的藥效，嚴重甚至有害健康，而生命條碼技術應用於藥用植物的鑑別，將可發展成為一套快速而有效率的鑑定系統，可針對市售中藥材產品之品質進行監控，值得我們重視。
3. 從學者的研究得知，目前市售中藥材普遍存在摻偽及摻雜的情形，譬如當歸摻偽、阿膠摻偽、白花蛇舌草摻偽、冬蟲夏草摻偽等等，深究其原因雖未必都是刻意為之，但植物品種的摻雜以使部分供應商從中可獲得極大利益，影響消費權益甚劇，台灣市售中藥材其源頭幾乎都是源自中國大陸，故可以想見台灣市售中藥材中一定也存在不少種原不純或摻偽摻雜之情形，或許可建議台灣對於進口中藥材之品質可加強前端源頭品質的管控，以保障國人購買中藥材的權益。
4. 參加在中國大陸舉辦的會議，除吸收科技新知以外，筆者亦可藉此機會收集科研素材，以充實筆者服務單位所進行之技術研發工作。基因改造植物鑑別為筆者服務單位重要的研究課題之一，從相關資料中得知中國大陸已有數種基改作物的種植，甚至已經商業化進入食品供應鍊中，但由於資訊相對封閉，加上赴大陸出差的機會不

多，雖有心瞭解陸方市售食品中含有基改作物成分之實況，卻因樣品取得不易而有許多窒礙難行之處，故筆者把握此次機會，至食品賣場收集相關研究樣品，購得包含黃豆、玉米、白米、糙米及油菜花粉等多種材料，對於筆者單位之研究工作，提供極具價值的研究樣本。

5. 筆者於大會中同步發表以 barcode gene 針對台灣特有真菌—牛樟芝之鑑別研究成果海報，將本署之學術研究成果與來自各國之專家學者進行交流，交換研究心得，提升台灣學術研究的國際能見度。現場多位與會人員及學者接對於筆者之研究內容感到興趣，前來與筆者討論及詢問研究內容，顯示本署的研究主題及相關技術與成果皆以達國際水準。本次大會許多以基因生命條碼針對中藥材及藥用植物的檢測技術研究報告，代表本署之鑑別技術研究走向是與目前的國際科研的發展趨勢一致，本署應持續致力於分生技術與生命條碼應用於物種鑑別之技術研發工作。
6. 目前中國大陸從事科學性基礎研究的單位及專家學者數量很多，政府不但重視基礎研究，研究經費亦相對充裕，所獲得的研究支持與資源也豐富。反觀國內，近年來因經濟不振因素，使得相關部門從事基礎研究或應用科學研究的經費皆大幅縮水，研究人力也限縮，此情況若無法改善，將限制我國在科技研究領域的發展，影響台灣的國際競爭力，應用心思考問題的本質。
7. 此次會議在中國大陸舉行並位於中國植物研究重鎮“昆明”，因此許多大陸學者於專題研討會中以英文報告研究成果，雖非每位中國的研究人員都能以流利的英文進行報告，但可以發現每位報告人都經過相當程度的準備與用功，才能完成一場成功的學術報告，這是一種自我成長及自我肯定的過程，非常值得推崇，故應鼓勵同仁把握每次出國參加相關研討會及專題研討會的機會，藉由與全球學者專家的交流互動，瞭解自己的不足，並獲得需自我成長與進步的動力，持續終身學習，提升公務人員專業研究能力，使出國經驗發揮最大之成效。

# 附件

【附件一】

**FIFTH INTERNATIONAL  
BARCODE OF LIFE CONFERENCE**  
**第五届国际生命条形码大会**  
[www.dnabarcodes2013.org](http://www.dnabarcodes2013.org)

**AGENDAS OF ALL SESSIONS**

**27-31 OCTOBER 2013**  
**KUNMING CHINA 中国·昆明**

NSFC CAS-TWAS Centre of Excellence for Biotechnology GenomeCanada life technologies KLPB



Conference Schedule - 5 <sup>th</sup> International Barcode of Life Conference					
Kunming, China: 27 - 31 October 2013					
Lian Yun Hotel	Sunday, 10/27	Monday, 10/28	Tuesday, 10/29	Wednesday, 10/30	Thursday, 10/31
Time	Main Conference				
8:00 - 8:30	Registration	Registration			
8:30 - 9:00	Registration	Opening Ceremony			
9:00 - 10:30	BOLD Workshop (Lecture)	1 <sup>st</sup> Plenary Session	3 <sup>rd</sup> Plenary Session	5 <sup>th</sup> Plenary Session	7 <sup>th</sup> Plenary Session
10:30 - 11:00		Break	Break	Break	Break
11:00 - 12:30	Lunch	2 <sup>nd</sup> Plenary Session	4 <sup>th</sup> Plenary Session	6 <sup>th</sup> Plenary Session	8 <sup>th</sup> Plenary Session
12:30 - 14:00		Lunch	Lunch	Lunch	Lunch
14:00 - 15:45	Discussion Session on Sequencing Methods and Next Generation Sequencing	1 <sup>st</sup> Parallel Session	Free Afternoon or Excursions	3 <sup>rd</sup> Parallel Session	5 <sup>th</sup> Parallel Session
15:45 - 16:15		Break		Break	Travel to KIB
16:15 - 17:30		2 <sup>nd</sup> Parallel Session	4 <sup>th</sup> Parallel Session	KIB Botanical Garden	
17:30 - 18:30	Break	Plenary Discussion	Free Night	Poster Session & Beverages	Closing remarks & Cocktail Hour at KIB
18:30 - 20:00	Welcome Reception Dinner at Lian Yun Hotel	Free Night		Free Night	Transport back to Hotels Free Night

【附件二】

Development of real-time PCR approach for rapid detection of *Antrodia cinnamomea*  
in foods

Hsiu-Wei Tsuei, Yuan-Hsin Chang, Zih-Ling Jia, Che-Yang Lin, Hsu-Yang Lin,  
Lih-Ching Chiueh, Daniel Yang-Chih Shih

Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan,  
Taiwan

*Antrodia cinnamomea* is a unique medicinal fungus in Taiwan. Many functional foods claimed to contain *Antrodia cinnamomea*-derived ingredients. In order to avoid fraudulent mislabeling, a reliable real-time PCR assay was developed for differentiating *Antrodia cinnamomea* from other fungus species. Specific primers and TaqMan probe based on barcode marker internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA were designed for detection of *Antrodia cinnamomea* in this study. The specificity of the method was evaluated by testing *Antrodia cinnamomea*, *Antrodia salmonea*, *Antrodia malicola*, medicinal fungus and medicinal plants. The results showed only *Antrodia cinnamomea* obtained specific reaction and no cross-reaction was observed with other species used in this study. Sensitivity tests revealed this method was sensitive in detecting the low levels of target DNA (120 fg/uL). Furthermore, this specific method was applied to 33 commercial samples comprising capsules, tea bags and drinks, and experimental data indicated the method could successfully identify the *Antrodia cinnamomea*-derived ingredients. In conclusion, the real-time PCR detection method developed herein was a rapid, sensitive and applicable detection tool for accurate identification of *Antrodia cinnamomea* ingredients in foods.

Key word: barcode, real-time PCR, *Antrodia cinnamomea*

# Development of Real-time PCR Approach for Rapid Detection of *Antrodia cinnamomea* in Foods

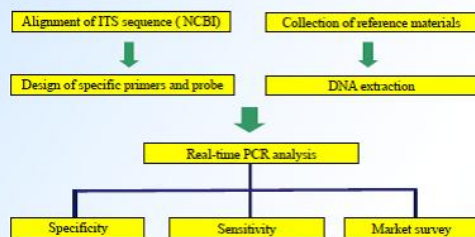


Hsiu-Wei Tsuei, Yuan-Hsin Chang, Zih-Ling Jia, Che-Yang Lin, Hsu-Yang Lin, Lih-Ching Chiu, Daniel Yang-Chih Shih  
Food and Drug Administration, Ministry of Health and Welfare, Executive Yuan, Taiwan

## Abstract

*Antrodia cinnamomea* is a unique medicinal fungus in Taiwan. Many functional foods claimed to contain *A. cinnamomea*-derived ingredients. In order to avoid fraudulent mislabeling, a reliable real-time PCR assay was developed for differentiating *A. cinnamomea* from other fungus species. Specific primers and TaqMan probe based on barcode marker internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA were designed for detection of *A. cinnamomea* in this study. The specificity of the method was evaluated by testing *A. cinnamomea*, *A. salmonea*, *A. malicola*, medicinal fungus and medicinal plants. The results showed only *A. cinnamomea* obtained specific reaction and no cross-reaction was observed with other species used in this study. Sensitivity tests revealed this method was sensitive in detecting the low level of 0.5 pg DNA. Furthermore, this specific method was applied to 33 commercial samples comprising capsules, tea bags and drinks, and experimental data indicated the method could successfully identify the *A. cinnamomea*-derived ingredients. In conclusion, the real-time PCR detection method developed herein was a rapid, sensitive and applicable detection tool for accurate identification of *A. cinnamomea* ingredients in foods.

## Methods



## Results

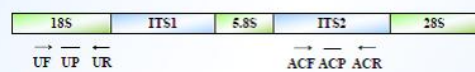


Figure 1. Positions of the primers and probes on nuclear ribosomal DNA (Specific primer/probe set: ACF/ACR/ACP; Universal primer/probe set: UF/UR/UP)

Table 1. Sequences of primers and probes used in this study

Primer /Probe	Sequence 5'-3'	Target gene	Amplicon (bp)
ACF	GGCTTGGATTGGAGGGTTA	ITS2	145
ACR	ATTAGAAGCGGATCCACCT	ITS2	
ACP	(FAM)-TGACTATCACACCATAAGGTCAA TCCACAAG-(TAMRA)	ITS2	
UF	CTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG	18S	158
UR	AGAACGGCCATGCACCACC	18S	
UP	(FAM)-TGGAGCTCCGGCTTAATTGACT CAAC-(TAMRA)	18S	

Table 2. List of fungus samples used in this study to verify the specificity of real-time PCR

Samples name	Origin	Specificity test
<i>Antrodia cinnamomea</i>	BCRC 35396	+
<i>Antrodia cinnamomea</i>	BCRC 35398	+
<i>Antrodia malicola</i>	BCRC 35452	-
<i>Antrodia salmonea</i>	BCRC 36938	-
<i>Phytophthora nanchukitspora</i>	BCRC 31900	-
<i>Cordyceps gracilis</i>	BCRC 32217	-
<i>Cordyceps memorabilis</i>	BCRC 32218	-
<i>Cordyceps militaris</i>	BCRC 32219	-
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	BCRC 32220	-
<i>Cordyceps militaris</i>	BCRC 33736	-
<i>Cordyceps brongniartii</i>	BCRC 33807	-
<i>Cordyceps sphingum</i>	BCRC 33821	-
<i>Cordyceps diprorigena</i>	BCRC 35725	-
<i>Cordyceps myrmecophila</i>	BCRC 35726	-
<i>Paeclomyces variotii</i>	BCRC 30562	-
<i>Paeclomyces lilacinus</i>	BCRC 31616	-
<i>Paeclomyces canadensis</i>	BCRC 33808	-
<i>Paeclomyces javanicus</i>	BCRC 35511	-
<i>Chrysosporium sp</i>	BCRC 30964	-
<i>Chrysosporium tropicum</i>	BCRC 32371	-
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	BCRC 33198	-
<i>Tolypocladium infatum</i>	BCRC 32862	-
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	BCRC 32866	-
<i>Tolypocladium infatum</i>	BCRC 33818	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	BCRC 35785	-
<i>Agaricus blazei</i>	BCRC 36913	-

+ positive result; - negative result

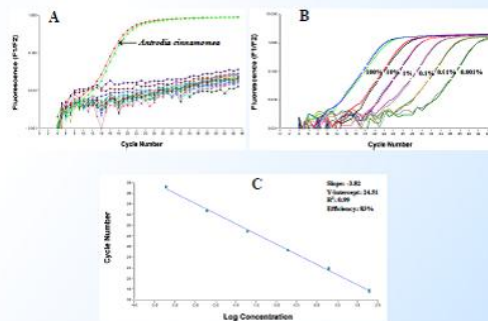


Figure 2. Specificity (A), sensitivity (B) and standard curve (10-fold serial dilutions, ranged from 50 to 0.0005 ng DNA) (C) of the *A. cinnamomea*-specific real-time PCR assay

Table 3. Market survey of *A. cinnamomea*-derived commercial products

Type of products	Ingredient labeling	Analysis for <i>A. cinnamomea</i>
Capsules (29 <sup>a</sup> )	<i>A. cinnamomea</i> (4)	+
	<i>A. cinnamomea</i> fruiting body (10)	+ <sup>b</sup>
	<i>A. cinnamomea</i> mycelium (7)	+ <sup>b</sup>
	<i>A. cinnamomea</i> extract (8)	+
Drinks (3)	<i>A. cinnamomea</i> extract	+ <sup>c</sup>
Tea bags (1)	<i>A. cinnamomea</i> fruiting body	+ <sup>c</sup>

+ positive result.  
<sup>a</sup> number of products examined.  
<sup>b</sup> 3 of 10 products contain trace amount of *A. cinnamomea* ingredient.  
<sup>c</sup> 1 of 3 products contain trace amount of *A. cinnamomea* ingredient.  
<sup>d</sup> products contain trace amount of *A. cinnamomea* ingredient.

## Conclusion

The development of specific and sensitive analytical methods to detect the presence of *A. cinnamomea*-derived ingredient in commercial functional food products is a great challenge. Real-time PCR method has been widely used in species identification in recent years. However, the applicability of the method primarily depends on the specificity of the primer and probe used. Herein, we present a novel real-time PCR assay using highly specific primers and TaqMan probe as a reliable detection method for distinguishing *A. cinnamomea* from related species to ensure consumer rights.

## Kunming Declaration on the Promotion of DNA Barcoding and Biodiversity Science

### 关于促进DNA条形码和生物多样性科学的昆明宣言

October 31, 2013

#### Context

Two large-scale collaborations, the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) and the International Barcode of Life project (iBOL), have created an international scientific community focused on the development and application of short standardised sequences, known as DNA barcoding, to discriminate the world's species.

These collaborations provided the initial organisational structure that built a community of practice through: 1) the promotion of barcoding and biodiversity science; 2) delivery of international training in barcoding and biodiversity research; 3) creation of an informatics platform for barcoding; 4) development of standards; and 5) support for international collaboration, including bi-annual meetings.

#### Recognition

Recognising the:

- Rapid expansion and diffusion of barcoding;
- Great potential for both scientific and social impacts of barcoding;
- Growth of the international community of practice;
- Need to sustain certain functions provided to date by CBOL and iBOL; and
- Requirement for best practices in governance for the barcoding community;

#### Declaration

**We Declare:**

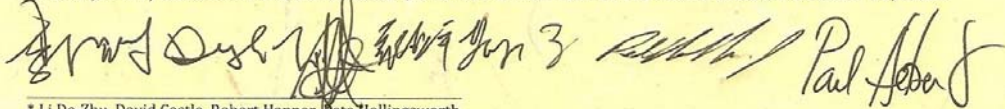
Barcoding is revolutionising how we study and document biodiversity. Advances in barcoding science, its application, and its impacts on society would benefit from having an international coordinating organisation that would promote:

1. Excellence in the science of barcoding of all domains of life;
2. Technological development to maximise the power and efficiency of barcoding techniques;
3. Development and adoption of barcoding applications to meet social challenges through a variety of mechanisms including not-for-profit and commercial activities;
4. Development of a reference library and associated standards including:
  - a. Technical standards for barcoding (markers),
  - b. Interoperability standards (informatics),
  - c. Regulatory standards using barcoding;
5. Accessibility of barcoding data, technologies and publications, recognizing constraints on the use of genetic resources in compliance with international and national laws on access and benefit sharing;
6. Engagement of other partners, including national governments, inter-governmental agencies, the private sector, and non-governmental organisations;
7. Expansion of the global barcoding community and international cooperation with particular attention to the developing world;
8. Development and delivery of training programmes to build global capacity, and integrate barcoding into all levels and types of education.

An *ad hoc* governance committee will be formed and will include the originators\* of the declaration and representatives of the diversity of the barcoding community. The *ad hoc* committee will be tasked with establishing the structure, governance and management of the proposed organisation within nine months. A period of open consultation will follow for three months, followed by incorporation of stakeholder views. The committee's activities will lead to the formal launch of the organisation at the 2015 Sixth International Barcode of Life Conference.

This Declaration was agreed upon at the Fifth International Barcode of Life Conference in Kunming, China, after a plenary discussion and consultation, and was announced at the Conference on October 31, 2013.

Signed by



\* Li De-Zhu, David Castle, Robert Hanner, Pete Hollingsworth